

## Uji Kualitas DNA Darah Pada Kertas *Whatman* Yang Diisolasi Dengan CHELEX-100 Serta Variasi Waktu Penyimpanan

Rita Maliza<sup>1,2\*</sup>, Lutfi Sukma Pratiwi<sup>1</sup>, Dyah Aryani Perwitasari<sup>3</sup>

- 1) Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- 2) Laboratorium Bioteknologi dan Biokimia, Program Studi Biologi, Fakultas Sains dan Teknologi Terapan, Universitas Ahmad Dahlan Yogyakarta
- 3) Fakultas Farmasi, Universitas Ahmad Dahlan, Yogyakarta

Correspondence to: malizarita@bio.uad.ac.id

### ABSTRACT

Tanggal Submit:  
14 April 2021

Tanggal Review:  
23 Oktober 2021

Tanggal Publish  
Online:  
2 Desember 2021

DNA extraction from dried blood spots was used for molecular analysis. Dried blood spots samples usually used FTA cards, but short-term use would come at a cost. This study aims to identify DNA extraction quality from dried blood spots in Whatman filter paper as an alternative storage sample. This study used 15 samples with three different storage times for 1, 3, and 7 days on 4°C. Dried blood samples were extracted using the Chelex-100 method, and qualitative were identified by electrophoresis. The DNA extraction was used as a template for PCR amplification of the *gapdh* gene. The result showed that DNA extraction showed bands from 1, 3, and 7 days, and PCR amplification showed bands in 200 bp. In conclusion, DNA from dried blood samples was stored for 1, 3 and 7 days in Whatman filter paper were successfully extracted by the Chelex-100 method and can be used as a DNA template for PCR amplification.

**Keywords:** *Chelex-100, Dried Blood Spot, Electrophoresis, Gapdh, PCR*

### PENDAHULUAN

Isolasi darah kering atau dried blood spots (DBS) merupakan metode alternatif yang digunakan untuk mengambil dan menyimpan sampel darah pada kertas saring. Penerapan metode ini telah dimanfaatkan untuk diagnosa medis, pengawasan obat, dan analisis genetika (Choi et al., 2014).

Penyimpanan sampel DBS umumnya dilakukan dengan menggunakan Flinders Technology Associates (FTA) cards. Sampel FTA dapat disimpan dalam jangka waktu yang lama hingga 17 tahun (Mullen et al., 2009; Halfon et al., 2012).

Bioanalisis menggunakan FTA cards membutuhkan biaya yang cukup besar untuk penelitian yang akan

dilakukan dalam jangka waktu yang singkat dan sampel dalam jumlah yang banyak, karena harga FTA cards yang mahal. Smit et al. (2014) melaporkan isolasi DNA proviral HIV-1 dengan menggunakan kertas Whatman memperlihatkan sensitivitas dan spesifitas deteksi sangat tinggi yaitu berkisar dari 97–100%. Dikshit et al. (2019) melakukan isolasi DNA dari kertas Whatman untuk meneliti penyakit epidemik, diperoleh konsentrasi DNA yang berkisar dari 64.8-720 ng/ $\mu$ L dan dapat digunakan untuk analisis PCR. Berdasarkan penelitian sebelumnya, belum adanya studi yang menguji keberhasilan isolasi DNA darah kering yang disimpan pada kertas Whatman dengan variasi waktu penyimpanan sampel selama 3, 5 dan 7 hari. Tujuan pada penelitian ini ingin melihat kualitas DNA yang dihasilkan dan analisis lanjut dengan amplifikasi gen sepsifik.

## METODE PENELITIAN

Jenis penelitian ini ialah deskriptif kualitatif yang bertujuan untuk melihat kualitas isolasi DNA sampel darah yang disimpan dalam variasi waktu berbeda pada kertas Whatman no. 42 dengan menggunakan metode isolasi DNA chelex 100. Sampel yang digunakan merupakan darah wholeblood yang dibagi menjadi tiga kelompok perlakuan penyimpanan, yaitu 1, 3, dan 7

hari dengan masing-masing kelompok berjumlah 5 sampel.

Isolasi DNA menggunakan metode Chelex-100. Sampel pada kertas Whatman dipotong-potong dengan ukuran  $\pm 2$  mm, selanjutnya dimasukkan ke dalam tube 1,5 mL. Sampel ditambahkan larutan Chelex-100 5% sebanyak 180  $\mu$ L yang sebelumnya telah dipanaskan pada suhu 100 °C. Sampel diinkubasi selama 10 menit pada suhu 99 °C kemudian disentrifugasi pada kecepatan 12.000 g selama 7 menit. Filtrat diambil dan disimpan pada suhu -20 °C. Uji kualitatif DNA dengan metode elektroforesis menggunakan konsentrasi gel agarose 1 % selama 30 menit dan voltase 100 A.

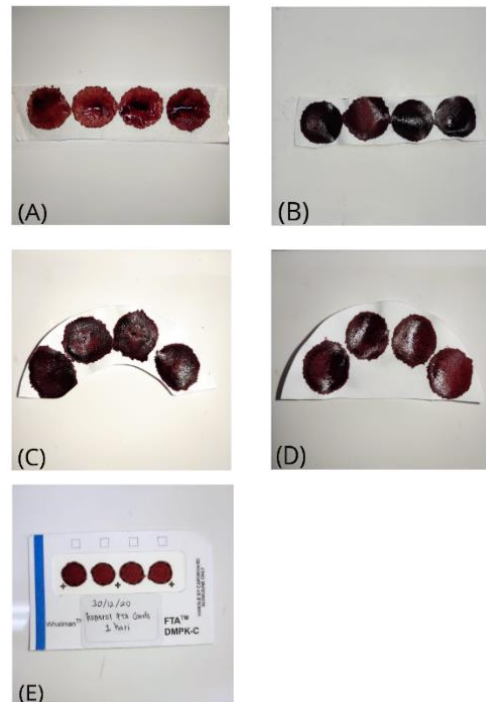
Analisis amplifikasi DNA hasil isolasi dilakukan dengan menggunakan primer spesifik gen Gapdh (forward: AGG TGA AGG TCG GAG TCA ACG dan reverse: GAT GAC AAG CTT CCC GTT CTC AG). Program denaturasi awal suhu 94 °C selama 5 menit, denaturasi 94 °C selama 30 detik, Annealing suhu 61 °C selama 30 detik. Extension pada suhu 72 °C, 40 detik, final extension suhu 72 °C selama 4 menit, dan proses amplifikasi dilakukan sebanyak 35 siklus. Hasil amplifikasi PCR dielektroforesis dengan

konsentrasi agarose 2% selama 80 menit  
60 A dan DNA ladder 100 bp.

## HASIL PENELITIAN

Identifikasi secara makroskopis sampel kertas Whatman dan FTA cards tidak mengalami perubahan warna sampel yang signifikan baik setelah darah ditotolkan ataupun setelah disimpan dalam jangka waktu 1, 3, dan 7 hari karena temperatur dan kelembapan telah terkontrol (Gambar 1).

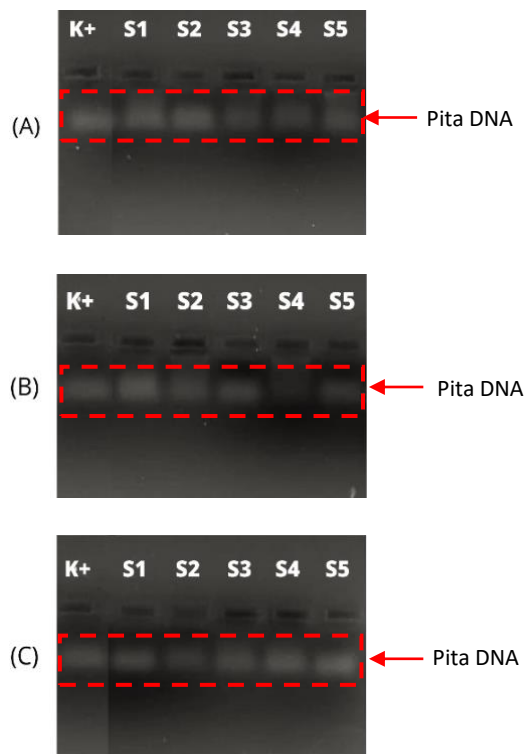
Isolasi DNA dilakukan dengan langkah awal memotong sampel kertas Whatman menjadi ukuran yang lebih kecil yang bertujuan untuk memudahkan proses pelepasan sel dari kertas Whatman. Sampel darah yang telah diisolasi selanjutnya diuji secara kualitatif dengan elektroforesis untuk melihat kualitas DNA. Hasil uji kualitatif sampel kertas Whatman satu hari ditunjukkan pada Gambar 2 A, pita DNA terlihat pada seluruh sampel berupa pita tunggal, pita terlihat jelas pada K+, S1, dan S2. S3, S4, dan S5 memiliki pita DNA yang terlihat kurang tajam dan smear.



Gambar 1. Maksiroskopis sampel darah kering sampel kertas *Whatman*. (A) setelah ditotolkan darah. (B) setelah disimpan selama 1 hari. (C) setelah disimpan selama 3 hari. (D) setelah disimpan selama 7 hari. (E) sampel darah FTA cards.

Hasil uji kualitatif sampel kertas *Whatman* tiga hari ditunjukkan oleh Gambar 2 B. Pita DNA tampak memiliki smear, redup dan lebih tipis pada S2 dan S4. Perbandingan dengan pita DNA pada K+, S1, S3, dan S5 yaitu berupa pita tunggal dan memiliki pendaran yang lebih jelas. Hasil uji kualitatif sampel kertas *Whatman* tujuh hari ditunjukkan pada Gambar 2 C. Pita DNA yang terlihat pada seluruh sampel merupakan pita tunggal yang tidak memiliki *smear*.

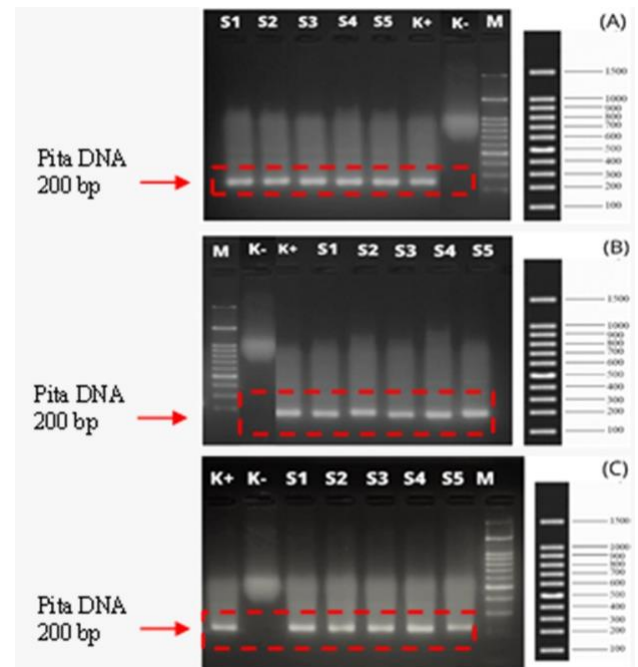
Pendaran pita tampak redup dan tidak terlalu tajam.



Gambar 2. Visualisasi hasil elektroforesis uji kualitatif DNA sampel kertas Whatman dengan metode Chelex-100. (A) satu hari, (B) tiga hari, (C) tujuh hari. K+ sampel darah FTA Cards; S1-S5 sampel (Agarose 1 %, 30 menit dan voltase 100 A)

Sampel yang telah selesai diuji kualitatif selanjutnya dilakukan proses amplifikasi PCR untuk mengetahui apakah DNA yang diisolasi dari sampel darah pada kertas Whatman dapat digunakan sebagai DNA template untuk amplifikasi segmen DNA yang spesifik. Primer Gapdh yang digunakan pada penelitian ini menunjukkan produk hasil amplifikasi pada panjang 200 bp (Gambar 3) sesuai dengan target

aplikasi. Pita DNA hasil amplifikasi gen gapdh terlihat di seluruh perlakuan penyimpanan yaitu 1, 3, dan 7 hari dengan persentase keberhasilan 100%.



Gambar 3. Visualisasi DNA hasil amplifikasi PCR gen Gapdh. (A) sampel kertas Whatman satu hari. (B) sampel kertas Whatman tiga hari. (C) sampel kertas Whatman tujuh hari. K+ sampel darah FTA Cards; K – DNA template berupa ddH2O; S1-S5 sampel (ladder 100 bp; Agarose 2%, 80 menit dan voltase 60 A.).

## PEMBAHASAN

Sampel darah kering kertas Whatman tampak berbentuk lingkaran dan memiliki warna merah baik sesaat setelah ditotolkan ataupun setelah penyimpanan selama 1, 3, dan 7 hari (Gambar 1). Perbandingan dengan sampel kertas Whatman dan FTA cards menunjukkan tidak terdapat perbedaan yang signifikan dan telah sesuai dengan

persyaratan sampel darah kering yang baik, yaitu darah berada di daerah sampel dan tidak saling bertumpukkan antara droplet satu dengan yang lain (Veenhof et al., 2019). Sampel darah kering perlu disimpan dalam kondisi yang stabil untuk mempertahankan tampilan makroskopis dan integritas sampel. Tingkat kelembapan yang tinggi dapat menyebabkan terjadinya difusi darah pada kertas saring sehingga daerah sampel akan melebar dan warna pudar (Denniff et al., 2010). Selain itu, dapat menyebabkan terjadinya hidrolisis dan memicu pertumbuhan mikroorganisme (Vu et al., 2011).

Chelex-100 merupakan resin yang tersusun dari styrene divinylbenzene copolymers yang memiliki sepasang ion iminodiasetat yang berfungsi sebagai pengikat ion logam polivalen seperti  $Mg^{2+}$  yang akan melindungi DNA dari enzim nuklease. Satu sampel darah kering memerlukan 50 - 60 Chelex beads untuk proses isolasi. pH yang dibutuhkan berkisar dari pH netral sampai dengan asam ( $< 4.0$ ) (Panda et al. 2019). Hasil isolasi dengan metode ini berwarna merah, hal tersebut menunjukkan masih terdapat pengotor pada DNA. Fatchiyah et al. (2011) melaporkan bahwa warna merah menandakan masih terdapat eritrosit.

Hasil visualisasi elektroforesis DNA sampel kertas Whatman

menunjukkan pendaran pita yang redup di seluruh sampel dan memiliki smear (Gambar 2). Semakin berpendar dan tajam pita DNA menandakan konsentrasi DNA yang tinggi (Stephenson, 2011; Wang et al., 2017). Hasil uji kualitatif yang menunjukkan pendaran pita yang redup menandakan konsentrasi DNA yang tidak terlalu tinggi. Panda et al. (2019) melaporkan bahwa proses pemanasan dapat menyebabkan denaturasi pada double stranded DNA sehingga menjadi single stranded DNA yang kurang stabil pada waktu penyimpanan. Pita DNA yang memiliki smear menandakan bahwa hasil isolasi DNA terdapat kontaminan seperti protein, RNA, DNA yang terdegradasi, ataupun larutan isolasi (Mawardi et al., 2020). Sutrisno et al. (2013) melaporkan bahwa terdapat resiko chelating agent ikut larut dalam proses isolasi.

Visualisasi hasil amplifikasi gen Gapdh pada sampel kertas Whatman menunjukkan pita DNA yang terang dan tajam tetapi masih terdapat smear atau pengotor (Gambar 3). Al-griw et al. (2017) melaporkan bahwa penggunaan Chelex-100 untuk isolasi DNA dapat mengurangi keberadaan PCR inhibitor yang dapat menghambat proses amplifikasi seperti komponen prophyrin dalam darah. Coleman (2017) dan Acharya et al. (2017) melaporkan kontaminan dapat berupa protein, RNA,

cross-contamination antar sampel, kontaminan dari lingkungan. Keberadaan kontaminan ini akan menghasilkan produk PCR yang relatif rendah karena energi yang dibutuhkan lebih besar untuk mengamplifikasi DNA target (Syafarruddin, 2011). Konsentrasi DNA yang rendah akan menyebabkan pita DNA yang tipis dan redup (Putri, 2015). Keberhasilan metode Chelex-100 untuk menghasilkan isolat DNA yang dapat dijadikan template untuk amplifikasi PCR juga telah dilaporkan oleh Walsh (2013) yang menggunakan sampel semen dan bercak darah untuk mendeteksi gen DQα. Pada penelitian ini semua DNA pada sampel yang diisolasi dari kertas Whatman dengan waktu penyimpanan berbeda dapat dijadikan DNA template untuk diamplifikasi. Hasil amplifikasi menggunakan primer Gapdh pada 200 bp memperlihatkan semua sampel dengan variasi penyimpanan dapat teamplifikasi dengan baik, meskipun terdapat smear yang disebabkan oleh pengotor pada hasil isolasi DNA tetapi hasil amplifikasi dapat diidentifikasi dengan jelas.

## KESIMPULAN

DNA sampel darah kering pada kertas Whatman yang disimpan selama 1, 3, dan 7 hari dapat diisolasi dengan metode Chelex-100 dan dapat dijadikan DNA template untuk diamplifikasi dengan primer gen target.

## DAFTAR PUSTAKA

- Acharya, K. R. et al. (2017) 'PCR Inhibition of a Quantitative PCR for Detection of Mycobacterium avium Subspecies Paratuberculosis DNA in Feces : Diagnostic Implications and Potential Solutions', 8(February), pp. 1–13.
- Al-griw, H. H. et al. (2017) 'Effects of storage temperature on the quantity and integrity of genomic DNA extracted from mice tissues : A comparison of recovery methods', 7, pp. 239–243.
- Choi, E. H. et al. (2014) 'Rapid DNA Extraction from Dried Blood Spots on Filter Paper: Potential Applications in Biobanking', *Osong Public Health and Research Perspectives*, 5(6), pp. 351–357.
- Coleman, W. B. and Tsongalis, G. J. (2017) *Pathology — The Polymerase Chain Reaction, Diagnostic Molecular Pathology*. Elsevier Inc.
- Denniff, P. and Spooner, N. (2010) 'Effect of storage conditions on the weight and appearance of dried blood spot samples on various cellulose-based substrates', *Bioanalysis*, 2(11), pp. 1817–1822.
- Dikshit, R. et al. (2019) 'Optimization of extraction of genomic DNA from archived dried blood spot (DBS): Potential application in epidemiological research & bio banking', *Gates Open Research*, 2, pp. 1–19.
- Halfon, P. et al. (2012) 'Detection of IL28B SNP DNA from buccal epithelial cells, small amounts of serum, and dried blood spots', *PLoS ONE*, 7(3), pp. 1–6.



- Mawardi, A., Maury, H. K. and Maladan, Y. (2020) 'Analisis Perbandingan Kualitas Produk Amplikon Gen PMSA-2 Antara Spesimen Spot Darah Kering dan Vena', 12(1), pp. 10–18.
- Mullen, M. P. et al. (2009) 'A note on the use of FTATM technology for storage of blood samples for DNA analysis and removal of PCR inhibitors', Irish Journal of Agricultural and Food Research, 48(1), pp. 109–113.
- Panda, B. B., Meher, A. S. and Hazra, R. K. (2019) 'Comparison between different methods of DNA isolation from dried blood spots for determination of malaria to determine specificity and cost effectiveness', Journal of Parasitic Diseases, 43(3), pp. 337–342.
- Putri, N.P.P.E., dan Junitha, E. I. (2015) Kualitas Dan Kuantitas Dna Darah Kering Pada Besi Dan Kayu Yang Disimpan Dalam Kurun Waktu Berbeda. Jurnal Biologi 19 (1): 21 - 24.
- Smit, P. W. et al. (2014) 'Review article: An overview of the clinical use of filter paper in the diagnosis of tropical diseases', American Journal of Tropical Medicine and Hygiene, 90(2), pp. 195–210.
- Stephenson, F. H. (2011) Calculations for Molecular Biology and Biotechnology: A Guide to Mathematics in Laboratory Second Edition. USA: Elsevier Inc.
- Sutrisno, I. K., Arundina, I. and Agung Sosiawan, D. (2013) Identifikasi bite marks dengan ekstraksi DNA metode Chelex (Bite marks identification with Chelex methods in DNA extraction), Dental Journal (Majalah Kedokteran Gigi).
- Syafaruddin dan T.J. Santoso. (2011) Optimasi Teknik Isolasi dan Purifikasi DNA yang Efisien dan Efektif Pada Kemiri Sunan (Reutalis trisperma (Blanco). Jurnal Littri 17: 11-17.
- Veenhof, H. et al. (2019) 'Performance of a web-based application measuring spot quality in dried blood spot sampling', Clinical Chemistry and Laboratory Medicine, 57(12), pp. 1846–1853.
- Vu, D. H. et al. (2011) 'Dried Blood Spots: A New Tool for Tuberculosis Treatment Optimization', pp. 2931–2939.
- Walsh, P. S., Metzger, D. A. and Higuchi, R. (2013) 'Biotechniques 30th anniversary gem Chelex 100 as a medium for simple extraction of DNA for PCR-based typing from forensic material', BioTechniques, 54(3), pp. 506–513.
- Wang, Y. et al. (2017) 'Binding Mechanism of Fluorescent Dyes to DNA Characterized by Magnetic Tweezers', in Materials Today: Proceedings. Elsevier Ltd, pp. S218–S225.